

VU Research Portal

The Road to HPV-Induced Keratinocyte Eternity: Molecular Characterization of HPV-Type Dependent In Vitro Immortalization

Schütze, D.M.

2016

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Schütze, D. M. (2016). *The Road to HPV-Induced Keratinocyte Eternity: Molecular Characterization of HPV-Type Dependent In Vitro Immortalization*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Hoe epitheelcellen onsterfelijkheid worden: Moleculaire karakterisering van in vitro immortalisatie door verschillende HPV types

Baarmoederhalskanker, alsook een deel van de andere anogenitale en hoofd-hals tumoren, wordt veroorzaakt door infectie met het humaan papillomavirus (HPV). Tot op heden zijn er meer dan 150 verschillende HPV types ontdekt. HPV infecteert epitheelcellen van de slijmvliezen of de huid en afhankelijk van het HPV type kan dit leiden tot de ontwikkeling van (genitale) wratten of kanker. Van de HPV types die met baarmoederhalskanker geassocieerd zijn, is bekend dat ze niet allemaal hetzelfde risico voor het ontstaan van kanker met zich meebrengen. HPV types die vaak in baarmoederhalskanker worden gevonden, zoals HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 en 59, worden als hoog-risico types (hrHPV) geclassificeerd. Andere types zoals HPV 26, 69, 82, 30, 53, 66, 68, 70, 73, 85, 97 en 67 worden minder vaak of zeer zelden in baarmoederhalskanker aangetroffen, maar komen wel vaker voor in voorloperlaesies van kanker. Van deze types is het risico om kanker te ontwikkelen niet duidelijk, en daarom worden deze HPV types als mogelijk hoog-risico types geclassificeerd. HPV types die alleen met genitale wratten zijn geassocieerd, zoals HPV6 en 11, worden als laag-risico types beschouwd.

Bij de meeste infecties wordt het virus vanzelf door het immuunsysteem geklaard, zonder enige nadelige consequenties. Als een infectie echter persisteert kan er na een periode van wel 10 tot 30 jaar baarmoederhalskanker ontstaan. De ontwikkeling van baarmoederhalskanker verloopt via voorloperlaesies, de zogeheten cervicale intra-epitheliale neoplasieën (CIN). Deze worden op basis van de ernst van de afwijking in drie gradaties ingedeeld, waarbij CIN1 als een laaggradige en CIN2 en CIN3 als hooggradige afwijkingen gezien worden. Tot op heden is het risico dat individuele HPV types geven op de ontwikkeling van baarmoederhalskanker en hooggradige voorloperlaesies (CIN2/3) alleen op basis

van epidemiologische data bekend. Het kanker-risico van minder vaak voorkomende HPV types is daardoor nog steeds onduidelijk en ook is onbekend hoe deze HPV types kanker veroorzaken. De meeste studies naar het ontstaan van baarmoederhalskanker door HPV zijn gebaseerd op de twee meest voorkomende types in baarmoederhalskanker, HPV16 en 18. Uit deze studies is gebleken dat wanneer de expressie van de zogenaamde virale oncogenen (kanker-inducerende genen) E6 en E7 ontregeld is en E6 en E7 in delende cellen tot expressie komen de celdeling verstoord raakt. Deze ontregelde expressie kan leiden tot de ontwikkeling van hooggradige voorloperlaesies en in zeldzamere gevallen tot kanker. Waarom E6 en E7 in deze gevallen in delende cellen tot expressie komt is nog deels onbekend en is daarom in **hoofdstuk 2** onderzocht. Voor het ontstaan van baarmoederhalskanker zijn naast ontregeling van virale oncogenen ook veranderingen in het genoom van de geïnfecteerde cel noodzakelijk. Tot op heden is het nog onbekend in hoeverre de genomische veranderingen die in tumoren worden gevonden afhankelijk zijn het specifieke HPV type dat aanwezig is.

Om dit te onderzoeken kan gebruik gemaakt worden van *in vitro* cellijn-modellen. Voor het onderzoek beschreven in dit proefschrift zijn cellijnen ontwikkeld die de virale oncogenen E6 en E7 van verschillende hoog-risico (hr) en mogelijk hrHPV types bevatten. Wij hebben onderzocht of deze cellen het vermogen krijgen om oneindig te delen (onsterfelijk of immortaal worden) en of dit samenhangt met veranderingen in bepaalde genen van de cel zelf (**hoofdstuk 3**). In **hoofdstuk 4 en 5** zijn de veranderingen in het genoom van de cellen onderzocht.

De E2 bindingssequenties (E2BS) van HPV16 zijn vaak gemethyleerd in baarmoederhalskanker

In eerste instantie hebben wij onderzocht waardoor de expressie van de virale genen E6 en E7 gedereguleerd raakt. Het was reeds bekend dat het uitschakelen van het virale eiwit E2 hier een rol bij speelt. E2 kan op twee verschillende manieren uitgeschakeld worden: 1) door integratie van het virale genoom in het

humane genoom, en 2) door methylering van bepaalde locaties in het hrHPV genoom (zogenaamde E2 bindingssequenties (E2BS)). Bij dit proces wordt er een methylgroep (-CH₃) aan één van de bouwstenen van het DNA gekoppeld (CpG), waardoor de DNA structuur verandert.

In **hoofdstuk 2** hebben wij DNA methylering van drie E2BS in het HPV16 genoom bepaald in zowel weefselbiopten als uitstrijkjes. Hiervoor hebben wij een nieuwe techniek ontwikkeld die gebaseerd is op een combinatie van een Methylering-Specifieke Independent PCR (MIP) en het Luminex xMAPTM systeem. Wij hebben aangetoond dat deze techniek uiterst gevoelig is en 0,5-1% gemethyleerd DNA in een achtergrond van niet gemethyleerd DNA kan detecteren. Alle onderzochte tumoren waren positief voor methylering van tenminste één van de drie onderzochte E2BS, tegenover 58% van de hooggradige voorloperlaesies en 24% van de controles. Onze resultaten geven aan dat methylering van de E2BS relatief laat optreedt tijdens het ontstaan van baarmoederhalskanker en dus waarschijnlijk niet de oorzaak is van E6 en E7 deregulatie. Desondanks zou methylering van de E2BS wel als biomarker voor de vroegdetectie van baarmoederhalskanker gebruikt kunnen worden. Hierbij is E2BS3 het meest veelbelovend, aangezien slechts 6% van de normale controles methylering liet zien op deze locatie, tegenover 47% van de hooggradige voorloperlaesies en 90% van de tumoren.

Immortalisatie van epitheelcellen is HPV type afhankelijk

Bij het ontstaan van kanker na een infectie met HPV is het onsterfelijk (immortaal) worden van epitheelcellen een hele belangrijke eerste stap. Gezonde cellen hebben een beperkte levensduur doordat bij elke celdeling de chromosoomuiteinden (telomeren) korter worden. Te korte telomeren leiden ertoe dat de cel stopt met delen en er een proces van zelfdoding geactiveerd wordt. Kanker cellen zijn onsterfelijk doordat het enzym telomerase actief is, waardoor de telomeren weer verlengen en de cellen kunnen blijven delen. Telomerase wordt geactiveerd door verhoogde expressie van het hTERT gen.

In **hoofdstuk 3** hebben wij cellijnmodellen ontwikkeld, om het vermogen te onderzoeken van verschillende hoog-risico en mogelijk hoog-risico HPV types om immortalisatie te induceren in gezonde cellen. Hiervoor hebben wij de virale oncogenen E6 en E7 van twee mogelijk hrHPV types (HPV66 en HPV70) en negen hrHPV types (16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52 en 59) in gezonde voorhuidcellen ingebracht. Om persoons afhankelijke invloeden uit te sluiten, zijn er cellen van twee tot drie verschillende donoren gebruikt. Na het inbrengen van de virale oncogenen hebben wij het groeipatroon van de cellen geanalyseerd. Daarnaast is ook het vermogen van de virale genen E6 en E7 om de tumorsuppressorgenen p53 en pRb, die normale celgroei controleren, uit te schakelen. Verder zijn de hierboven beschreven kenmerken van immortalisatie, te weten hTERT opregulatie en telomerase activatie onderzocht. Een laag-risico HPV type (HPV-11) en de lege vector zijn meegenomen als negatieve controles. De verschillende cellijnen lieten verschillen in groei zien, waarbij cellen met HPV16, 31, 33, 35 en HPV18 in iets mindere mate, constant door bleven groeien. Cellen met HPV45, 51, 52, 59, 66 en 70 kwamen na een fase van verlengde groei in een fase terecht met veel celdood en weinig groei, de zogenaamde crisis fase. Na deze fase groeiden in de meeste gevallen immortale cellen uit. Uitzonderingen, waarbij geen immortalisatie plaatsvond, waren twee van de drie HPV45-bevattende cellijnen, een van de drie HPV51-bevattende cellijnen en alle drie de HPV52-bevattende cellijnen. De verschillen in immortalisatie capaciteit bleken geassocieerd met een vroege opregulatie van hTERT expressie en een betere afbraak van p53 door E6 in de cellijnen die geen crisis ondergingen (cellen met HPV16, 18, 31, 33, en 35). Samenvattend heeft deze studie aangetoond, dat de geteste HPV types verschillen in hun vermogen om epitheelcellen te immortaliseren. Teven is aangetoond, dat de mogelijk hoog-risico HPV types 66 en 70 wel degelijk de potentie hebben om kanker te veroorzaken.

HPV type specifieke immortalisatie is onafhankelijk van DNA methylering

Het feit dat er ondanks een lange crisisperiode immortale cellen uitgroeiden bij de HPV types 45, 51, 59, 66 en 70 geïnfecteerde cellen, suggereert dat in deze cellen additionele (epi)genetische veranderingen betrokken zijn bij immortalisatie. Anderzijds kan het moment waarop deze DNA veranderingen optreden variëren tussen cellen zonder crisis (met HPV16, 18, 31, 33 en 35) en cellen met crisis (met HPV 45, 51, 59, 66 en 70). Hierdoor zou bijvoorbeeld een crisisperiode bij infectie met meer oncogene HPV types (i.e. HPV16, 18, 31, 33 en 35) voorkomen kunnen worden. In **hoofdstuk 4** is onderzocht in hoeverre epigenetische veranderingen, zoals DNA methylering van humane genen, betrokken is bij immortalisatie door de verschillende HPV types. Hiervoor zijn als uitgangspunt genen onderzocht die vaak in baarmoederhalskanker gemethyleerd zijn, namelijk APC, CADM1, CYGB, FAM19A4, hTERT, miR124-1, miR124-2, miR124-3, MAL, PHACTR3, PRDM14, RASSF1A, ROBO3, en SFRP2. Van deze genen is voor CADM1, hTERT, MAL, miR124, PRDM14 en SFRP2 aangetoond dat ze een directe rol spelen bij het ontstaan van baarmoederhalskanker. De verschillende cellijnen zijn op vier verschillende stadia (mortaal tot laat immortaal) tijdens hun immortalisatie-proces onderzocht op methylering. Over het algemeen bleek dat methylering al vroeg optrad en er een progressieve toename was van zowel de hoogte van methylering als van het aantal gemethyleerde genen. In mortale cellen (stadium 1) waren de genen hTERT, miR-124-2 en PRDM14 al verhoogd gemethyleerd in vergelijking met HPV-negatieve controles. Dit werd gevolgd door methylering van ROBO3 in vroege immortale cellen (stadium 2 cellen) en CYGB in middel immortale cellen (stadium 3). In late immortale cellen (stadium 4) namen wij ook verhoogde methylering waar van FAM19A4, MAL, PHACTR3 en SFRP2. Over het algemeen was er geen relatie tussen het groeipatroon (met of zonder crisis) van de HPV-geïnfecteerde cellen en het methyleringspatroon. Alleen hTERT liet een significant hogere methylering zien in stadium 2 (vroeg immortale) cellen die een crisisperiode hadden ondergaan. DNA methylering van hTERT leidt tot activatie van het gen en daarmee van telomerase.

Dit duidt erop dat methylering van hTERT in de cellijnen met minder oncogene HPV types (i.e. HPV 45, 51, 59, 66 en 70) heeft bijgedragen aan de immortalisatie van deze cellen. In de cellen die geen crisis hadden ondervonden was hTERT ook geactiveerd in stadium 2 cellen terwijl we weinig tot geen hTERT methylering vonden, wat suggereert dat in deze cellen hTERT direct door E6 geactiveerd zou kunnen zijn.

De methylering van het hTERT gen in stadium 3 cellen is nog verder onderzocht met behulp van een specifieke sequencingtechniek (bisulfiet sequencing), die de methyleringsstatus van individuele CpG's kan bepalen. Hiermee konden wij bevestigen dat er meer hTERT methylering is in HPV geïnfecteerde cellen vergeleken met de controles en ook dat de promoterregio die de expressie direct reguleert ongemethyleerd bleef.

HPV-specifieke immortalisatie is afhankelijk van het aantal chromosomale afwijkingen

In **hoofdstuk 5** is de rol van genetische veranderingen bij HPV-geïnduceerde immortalisatie onderzocht. Genetische veranderingen betreffen onder andere mutaties, waarbij de genetische code verandert, of chromosomale afwijkingen, waarbij de hoeveelheid van het genetische materiaal (chromosomen) verandert. Met behulp van een zogenaamde hoog-resolutie chromosoom array (high-resolution array comparative genomic hybridisation (arrayCGH)) zijn chromosomale afwijkingen onderzocht in mortale en immortale passages van de verschillende HPV-bevattende cellijnen. De immortale cellijnen vertoonden meer chromosomale afwijkingen dan de mortale voorlopercellen. Het was zeer interessant om te zien dat immortale cellen, die eerder een crisisperiode hebben gehad, meer chromosomale afwijkingen lieten zien dan de cellijnen zonder crisis. Hieruit blijkt dat de hogere immortalisatie capaciteit van HPV16, 18, 31, 33 en 35 niet geassocieerd is met meer chromosomale veranderingen. In plaats daarvan bleken chromosomale veranderingen juist nodig om immortalisatie te bewerkstellingen in

cellijnen die geïnfecteerd waren met minder oncogene HPV types. Dit impliceert dat de chromosomale veranderingen gebieden betreffen waar genen liggen die bijdragen aan de ontwikkeling van kanker (activatie van oncogenen) of die kankerontwikkeling remmen (uitschakelen van tumorsuppressorgenen). De chromosomale veranderingen leiden hierdoor tot een groeivoordeel en dragen daarmee bij aan het immortalisatieproces. Ook interessant was de observatie dat een toename van chromosoom 5 op de regio waar het hTERT gen ligt, alleen voorkwam in cellijnen die een crisis hadden ondergaan. De verschillen in chromosomale veranderingen tussen cellen met en zonder een crisis waren overigens niet het gevolg van een verschil in DNA breuken die direct door het virus worden veroorzaakt. Ook laten onze voorlopige onderzoeken zien dat mutaties in bekende kanker genen niet optreden tijdens immortalisatie.

Hoofdstuk 6 beschrijft naast een samenvatting van voorgaande hoofdstukken ook een algemene discussie over de resultaten beschreven in het proefschrift en de mogelijkheden voor toekomstige studies en toepassingen.

Samenvattend hebben de resultaten zoals beschreven in dit proefschrift tot nieuwe inzichten geleid in het ontstaan van baarmoederhalskanker door verschillende HPV types. Dit betreft met name de regulatie van de virale genexpressie door DNA methylering als ook HPV type afhankelijke mechanismen die bijdragen aan *in vitro* immortalisatie.

Een ontregelde expressie van de virale oncogenen E6 en E7 is een eerste belangrijke stap voor het ontstaan van kanker en wordt al gezien in hooggradige voorloperlaesies. In **hoofdstuk 2** toonden wij aan dat niet in alle hooggradige voorloperlaesies met ontregelde E6 en E7 expressie, deze verklaard kan worden door methylering van de onderzochte E2 bindingssequenties. In deze gevallen zou de ontregelde expressie van E6 en E7 mogelijk verklaard kunnen worden door andere mechanismen, zoals veranderde transcriptiefactorbinding en/of virale integratie. Methylering van de E2 bindingssequenties werd overigens wel gevonden in alle tumoren en lijkt dus belangrijk voor het ontstaan van kanker.

De resultaten beschreven in **hoofdstuk 3 t/m 5** laten zien dat HPV types verschillen in hun capaciteit om epitheelcellen te immortaliseren. Dit uit zich in een groei met of zonder crisis, waarbij de cellen met een crisis meer chromosomale veranderingen laten zien. Deze chromosomale veranderingen leiden tot een groeivoordeel waardoor een deel van de cellen de crisis kunnen overwinnen. Andere DNA veranderingen zoals DNA methylering en DNA mutaties blijken niet geassocieerd te zijn met de verschillen in virale immortalisatie capaciteit. Al onze bevindingen zijn gebaseerd op cellijnmodellen waarbij de virale oncogenen E6 en E7 via een retrovirus tot expressie zijn gebracht. Hierdoor is de expressie van E6 en E7 mogelijk hoger dan in een natuurlijke situatie en wordt de immortalisatie capaciteit mogelijk overschat of worden subtiele verschillen uitgevaagd. Bovendien is in onze studies de mogelijke rol van andere virale genen niet onderzocht. Voor een meer fysiologische aanpak zouden in de toekomst primaire cellen met het hele HPV genoom geïnfecteerd kunnen worden. Ook is het interessant om naast de voorhuid epitheel cellen die nu gebruikt zijn, ook andere epitheel cellen zoals die van de baarmoederhals of het hoofd-hals gebied te testen.

De hier ontwikkelde cellijnmodellen bieden een uitstekende basis voor toekomstige studies om beter inzicht in de ontwikkeling van baarmoederhalskanker door verschillende HPV types te verkrijgen. Bovendien kunnen de cellijnmodellen bijdragen tot de ontdekking van biomarkers voor de vroege opsporing van baarmoederhalskanker of de ontwikkeling van een HPV type-specifieke therapie.